

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 6 - 3 1 6 5 2 7

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 11 月 15 日

(51) Int. Cl.

A61K 35/78

識別記号

AAM

庁内整理番号

M 7822-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平 3 - 1 0 6 3 1 4

(22) 出願日 平成 3 年 (1991) 3 月 26 日

(71) 出願人 591097584

毛利 哲郎

富山県中新川郡立山町浅生 140

(71) 出願人 591097595

清水 岑夫

富山県富山市南田町 1 丁目 4 - 7

(71) 出願人 591097609

千葉 賢三

石川県金沢市鈴見台 5 丁目 3 - 25

(72) 発明者 毛利 哲郎

富山県中新川郡立山町浅生 140

(74) 代理人 弁理士 萩野 平 (外 3 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経細胞賦活物質の製法

(57) 【要約】

【目的】 本発明はアルツハイマー病等の予防および治療に有用な神経細胞賦活物質を提供することである。

【構成】 薬用ニンジンのアルコール抽出物を減圧濃縮し、水に懸濁させて極性の低い有機溶媒で抽出することを特徴とする神経細胞賦活物質の製法である。

【効果】 本発明による作用物質は NGF と同様な神経細胞賦活作用を有し、アルツハイマー病、老人性痴呆症などの予防および治療に極めて有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬用ニンジンアルコール抽出液を減圧濃縮し、こうして得られた濃縮物を水に懸濁させ極性の低い有機溶媒で抽出して脂溶性エキスを得ることを特徴とする神経細胞賦活物質の製法。

【請求項2】 極性の低い有機溶媒としてエーテル、酢酸エチル、クロロホルムを使用することを特徴とする請求項1に記載の製法。

【請求項3】 請求項1で得た脂溶性エキスを更に薄層クロマトグラフィー処理してRf値0.5以上の画分を得ることを特徴とする神経細胞賦活物質の製法。

【請求項4】 アルコール抽出を還流下で行い、熱時ろ過してアルコール抽出物を得ることを特徴とする請求項1または2に記載の製法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は神経細胞賦活物質の製法に関するものであり、特に、アルツハイマー病、老人性痴呆症または脳栄養不良に基づく脳組織の壊死の予防および治療に役立つ神経細胞賦活物質の製法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、アルツハイマー病、老人性痴呆症、その他の脳神経細胞の壊死を伴う疾病を、直接その細胞を賦活することにより予防、あるいは治療する薬剤は完成されていない。現状ではニンジンを煎剤とするか、アルコールエキス（含量14%以上）としたものが試用されているに過ぎない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、記憶の障害、行動の不安定、老令化が現われる初期の状態、内服することにより直接脳細胞に達して神経細胞を賦活する物質を提供することである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、従来強壮剤として漢方処方に用いられてきた薬用ニンジンをアルコール抽出し、次いでこうして得た抽出物を更に極性の低い有機溶媒、例えばエーテルで抽出することにより得られた脂溶性エキスを、神経細胞を賦活して、その分化を促進することを見出して本発明を完成した。

【0005】 上記のようにして得られた神経細胞賦活物質を含有する脂溶性エキスは、更に薄層クロマトグラフィーにかけることによりRf=0.5以上のもの（画分A）とRf=0.5以下のもの（画分B）に分画することができ、この画分Aは更に顕著な神経細胞賦活作用のあることを見出した。

【0006】 薬用ニンジンの水溶性エキに含まれるサボニン（ジンセノシドRb<sub>1</sub>など）は、ニワトリ胚脊髄後根の神経細胞を活性化し、その分化を促進して、神経突起の成長を起すことは、既に報告されている。しか

し薬用ニンジンの脂溶性エキスの神経細胞に対する作用については知られていない。本発明者等は、薬用ニンジンのアルコール抽出物から、更にエーテル、クロロホルムあるいは酢酸エチル等の極性の低い有機溶媒で抽出して得た脂溶性エキス（サボニンは含まれていない）について、ラット副腎髄質褐色腫由来のPC12h細胞の培養を用い、神経突起の成長と、アセチルコリンに対する反応性、及び細胞膜脱分極により誘導されるカルシウム取り込みなどを指標として、神経細胞分化促進作用を見いだした。

【0007】 一般に神経成長因子（NGF）は、PC12またはPC12h細胞の形態を4～9日後に扁平にし、神経突起または神経繊維を伸長させ、また、大脳の中隔、対角帯核またはマイネルト核に発するコリン作動性神経に作用してその分化を誘導し、アセチルコリン合成を促進する。従ってアルツハイマー病はNGFの欠損が病態であるとも考えられていて、NGFはアルツハイマー病などの治療薬としても期待されているが、現状ではヒトNGFは供給されていないので、老化予防にはこの因子の分泌を促進するか、またはこれに代わる作用物質が求められている。しかしながら、驚くべきことに、本発明方法によって得られる脂溶性エキス及び画分Aは、NGFに匹敵する神経細胞賦活作用をPC12h細胞に対して示し、アルツハイマー病等の予防および治療に極めて有用な物質であると言える。本発明方法によって得られる脂溶性エキス及びエキスAは小腸より良く吸収され、また脳血液関門も通過することができ、注射剤としても使用することができる。

【0008】 本発明方法によって得られる神経細胞賦活物質は、経腸的に、例えば0.1～0.5gの1日投与量で適用することができ、また、非経腸的（静脈注射剤として）に1日投与量10～50mgで投与することができる。以下の実施例によって本発明を更に具体的に説明する。

## 【0009】 実施例1

本発明による神経細胞賦活物質の製造

薬用ニンジン200gを150mlのアルコール中、1時間還流後、温時ろ過する（この操作を三回繰返す）。ろ液を減圧濃縮し、これを蒸留水150mlに懸濁し、エーテルを100ml加えて抽出する（この操作を三回繰返す）。このエーテル層を濃縮して約1.03gの脂溶性エキスを得る。エーテルの代わりに酢酸エチル、あるいはその他の極性の低い有機溶媒を用いても良い。こうして得られた脂溶性エキスは独特の芳香があり、無味、褐色～黒褐色で高い粘性を有する。pH6～7。クロロホルム-アルコール混液によく溶解し、アルコールに一部溶解するが、水、熱湯のいずれにも溶解しない。

【0010】 本発明による物質の活性作用試験細胞の培養

PC12h細胞は1975年に、ラット副腎髄質褐色細

3

胞腫から母株が分離され、その後畚中 寛らによってクローン化された樹立細胞で、神経成長因子 (NGF) の刺激により神経細胞様に分化して、神経突起を伸ばす特徴がある。この細胞をポリリジン、あるいはコラーゲンで細胞接着面をコーティングしたプラスチック製の培養フラスコ、あるいはシャーレの中で静置培養した。培地はダルベッコ変法 MEM 培地に 5~10% (v/v) 馬血清と 5~10% (v/v) 牛胎児血清を含み、37℃、5~10% CO<sub>2</sub> 混有空気 (水蒸気飽和) 中で pH 7.2~7.4 に保った。

#### 【0011】試験方法

本発明による物質を 50% ジメチルスルフォキシド水溶液 (一部懸濁あり) とし (40~100 mg/ml)、高圧滅菌 (5 分) 後試験培地に直接添加した。培地中の最終エキスの濃度は 0.025~0.25 mg/ml である。35 mm シャーレに細胞を約 2 万個ずつ分注し、翌日細胞が容器に付着してから試験培地 (2 ml/シャーレ) に交換して、4 日、ないし 8 日間培地交換しないで培養し、毎日光学顕微鏡により形態観察した。また一部についてはオリンパス社製 XL500 高速画像解析システムを使って、神経突起成長度を毎日測定した。またメリディアン社製細胞解析装置 (ACAS) を使い、試験培地処理細胞のカルバコール (アセチルコリン・レセプター アゴニスト) 刺激、あるいは KCl 40 mM 添加直後の細胞内遊離カルシウム濃度の変化をモニターした。

#### 【0012】試験結果

##### 1. 細胞形態および神経突起の成長に及ぼす作用

作用物質溶液の 0.025、0.05、0.1、または 0.25 mg/ml を、試験第 1 日目に培地に加えて培養 4 日後に細胞の形態を顕微鏡観察した。対照には培地に 0.1% のジメチルスルフォキシドを加えた。この最低濃度では明らかな形態変化は見られなかったが、0.05 mg/ml 以上の濃度では、濃度増加に応じて細胞が扁平、角型となり、また神経突起の数の増加、またはその伸長が顕著となった。0.025~0.1 mg/ml の作用物質溶液を培地に添加し、6 日間神経突起の成長 (この場合は毎日各濃度 15~25 個の細胞の顕微鏡像を画像処理し、細胞当たりの突起の総面積 (平方マイクロメートル/細胞) の平均値とその標準誤差で表した) を測定した結果を、対照の測定結果とともに図 1 に示す。やはり添加濃度に応じて、また培養日数とともに突起の成長が数値的に証明された。最低濃度においても、5 日以後突起の明らかな成長が見られた。

##### 【0013】2. 神経刺激による細胞内遊離カルシウム濃度の変化

作用物質溶液を 0.1 mg/ml 培地に加え、7 日間培養後細胞にカルシウム感受性蛍光色素フルオ 3 を取り込ませてから、培養シャーレに灌流装置を取り付け、カルバコール (最終濃度 0.1 mM) 添加直後、あるいは高

4

KCl 溶液 (最終濃度 40 mM) 添加直後の個々の細胞の中のカルシウム濃度変化を、ACAS を用いてモニターした。対照の培地には、0.1% ジメチルスルフォキシドを加え、7 日間細胞培養後エキスを群と同様にカルシウム濃度変化を測定した。その結果、カルバコールに対する反応性は、各細胞で対照よりもエキスを前処理の方が一般に大きく (図 2 (A)、(B))、それらの蛍光変化 (カルバコール添加前の蛍光強度に対する添加後の蛍光ピークの増加比) を各群間で統計処理すると、表 1 に示すように、エキスを処理群で有意な増加 (56% 増) が見られた。このことは細胞をエキスを前処理することにより、アセチルコリンレセプターが増加し、その結果カルシウムチャンネルが活性化されていることを示す。また高カリウム (KCl) 液による細胞膜脱分極によって誘導されるカルシウム取り込みは、各細胞で対照よりもエキスを処理の方が一般に大きく (図 3 (A)、(B))、それらの蛍光変化 (KCl 添加前に蛍光強度に対する添加後の蛍光ピークの増加比) を各群間で統計処理すると、表 1 に示すように、エキスを処理群で有意な増加 (53% 増) が見られた。このことは細胞をエキスを処理することにより、カルシウムチャンネルそのものの感受性も増大していることを示す。

#### 【0014】

##### 【表 1】

【0015】これらの結果より、アセチルコリンに対する反応性の面からも、PC12h 細胞はニンジンエキスを処理により分化が促進され、神経機能が賦活されていることがわかる。

#### 【0016】実施例 2

実施例 1 によって得た脂溶性エキスをシリカゲル薄層クロマトグラフィーに付した。TLC プレート: Merck 製、シリカゲル 60 F<sub>254</sub> (0.25 mm); 展開溶媒: 石油ベンゼン/酢酸エチル (1:1); 呈色: 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 噴霧後 110℃、5 分加熱。このクロマトグラムを図 4 に示す。このクロマトグラムにおいて紫色を呈するスポット (R<sub>f</sub> 値 0.56) を含む R<sub>f</sub> 値 0.5 より大きい部分をまとめて画分 A とし、0.5 より小さい部分をまとめて画分 B とする。画分 A、B を掻きとって、それぞれ酢酸エチル、エーテル (1:1) 混液で再抽出し、溶媒を減圧下留去してエキス A、B を得た。この内エキス A の方に著しい PC12h 細胞の突起成長促進作用が認められた。

#### 【0017】

【発明の効果】本発明方法によって得られるニンジンの脂溶性エキス及びエキス A は顕著な神経細胞賦活作用を示し、アルツハイマー病などの予防および治療に極めて有用な物質である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の作用物質による神経突起の成長 (突起の総面積) の培養日数による変化を示す図である。

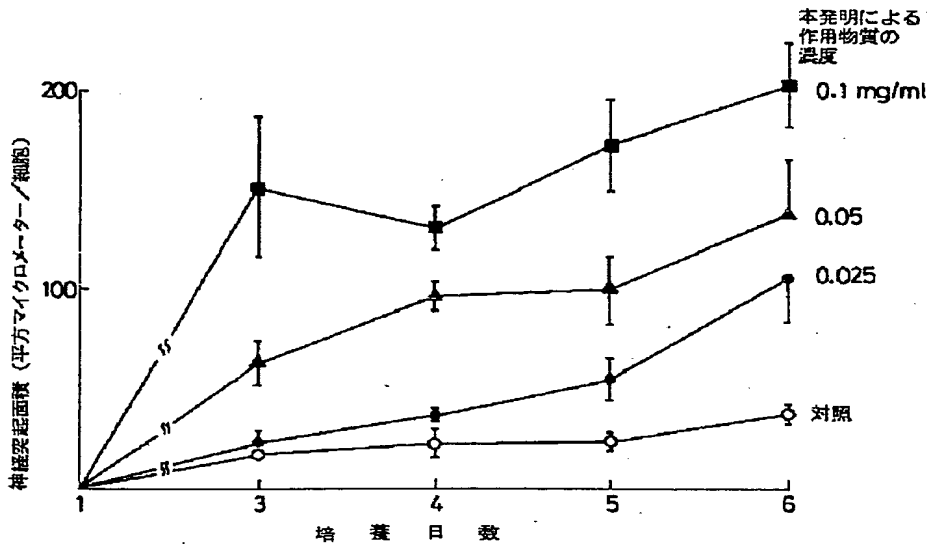
【図 2】 図 2 (A) および (B) は対照実験と本発明の作用物質によるカルパコールの蛍光変化を示す図である。

場合の同様な蛍光変化を示す図である。

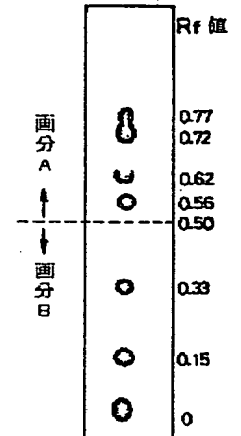
【図 4】 本発明による作用物質を薄層クロマトグラフィーにかけたときの画分 A と B の状態を示す図である。

【図 3】 図 3 (A) および (B) は高カリウム液添加の

【図 1】

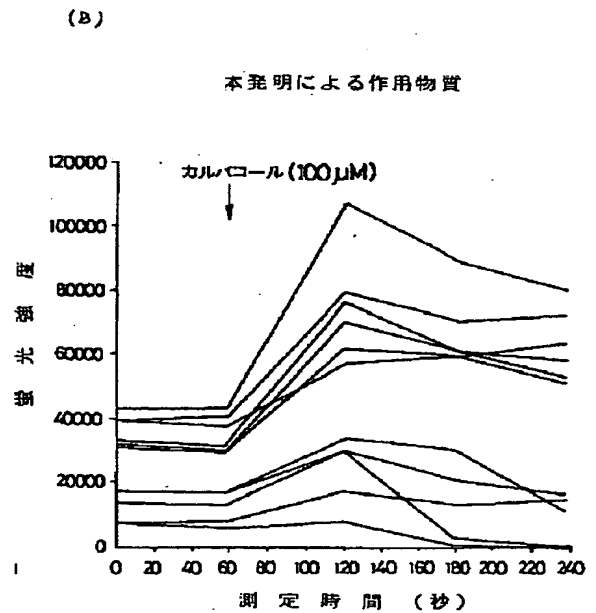
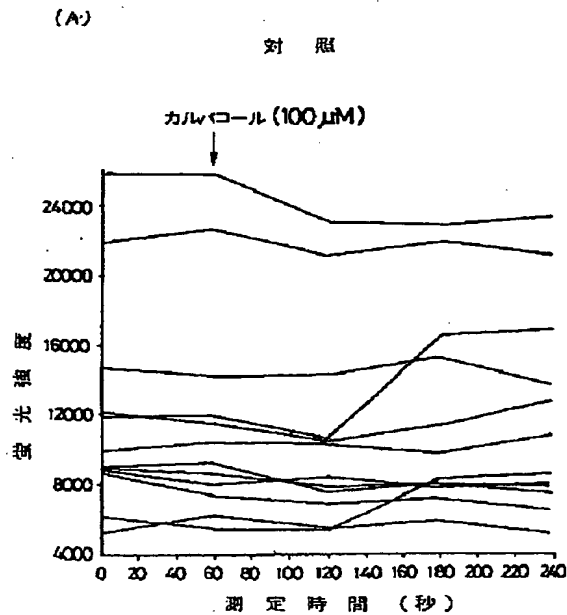


【図 4】



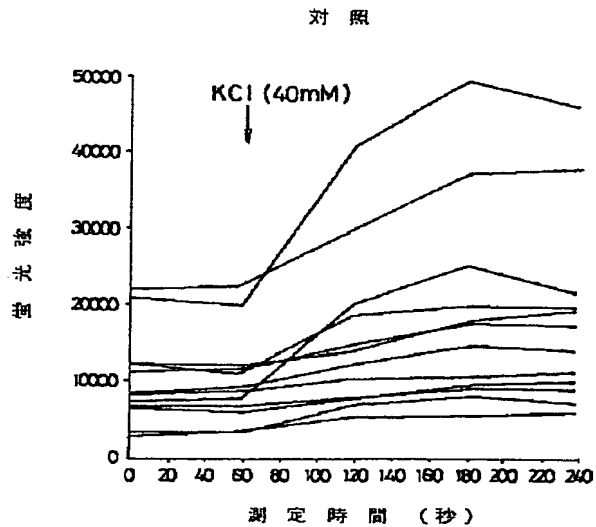
【図 2】

【図 2】



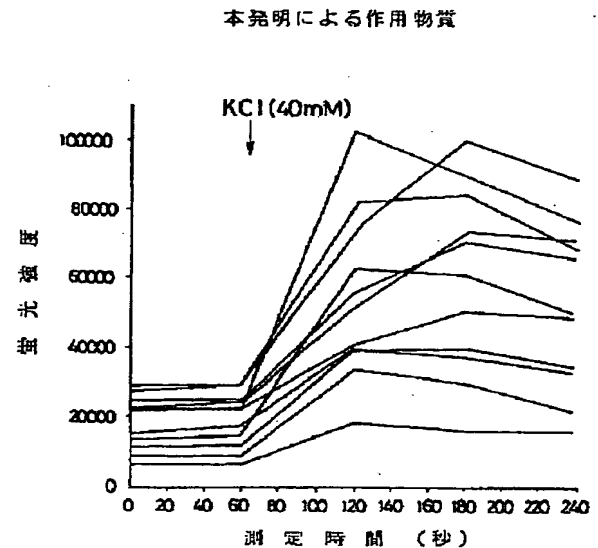
【図 3】

(A)



【図 3】

(B)



【手続補正書】

【提出日】平成 3 年 6 月 1 0 日

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 7

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 0 7】一般に神経成長因子 (NGF) は、PC 1 2 または PC 1 2 h 細胞の形態を 4 ~ 9 日後に扁平にし、神経突起または神経繊維を伸長させ、また、大脳の中隔、対角帯核またはマイネルト核に発するコリン作動性神経に作用してその分化を誘導し、アセチルコリン合成を促進する。従ってアルツハイマー病は NGF の欠損

が病態であるとも考えられていて、NGF はアルツハイマー病などの治療薬としても期待されているが、現状ではヒト NGF は供給されていないので、老化防止にはこの因子の分泌を促進するか、またはこれに代わる作用物質が求められている。しかしながら、驚くべきことに、本発明方法によって得られる脂溶性エキス及び画分は、NGF に匹敵する神経細胞賦活作用を PC 1 2 h 細胞に対して示し、アルツハイマー病等の予防および治療に極めて有用な物質であると云える。本発明方法によって得られる脂溶性エキス及び画分 A は小腸より良く吸収され、また脳血液関門も通過することができ、注射剤としても使用することができる。

【手続補正書】

【提出日】平成 6 年 5 月 2 3 日

【手続補正 1】

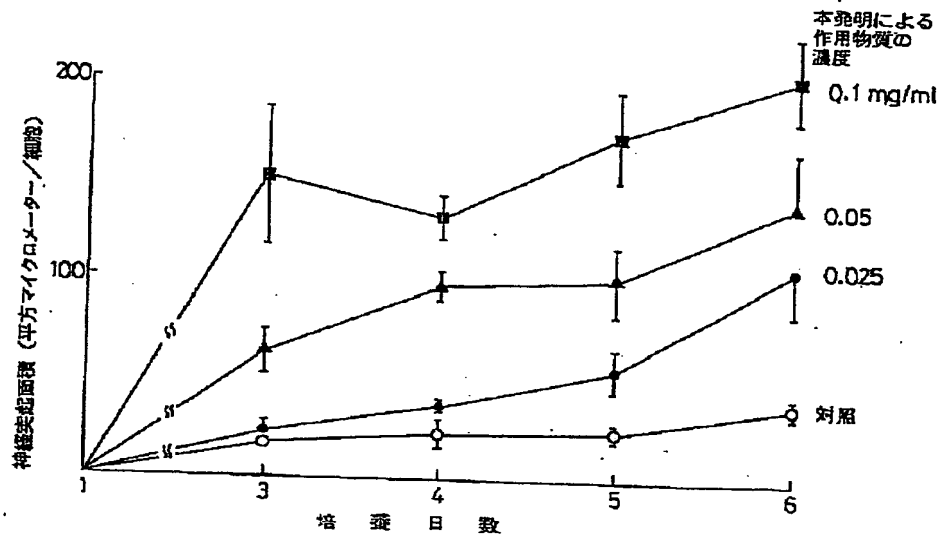
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

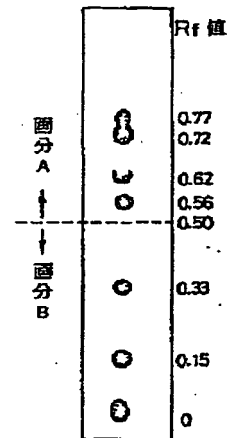
【補正方法】変更

【補正内容】

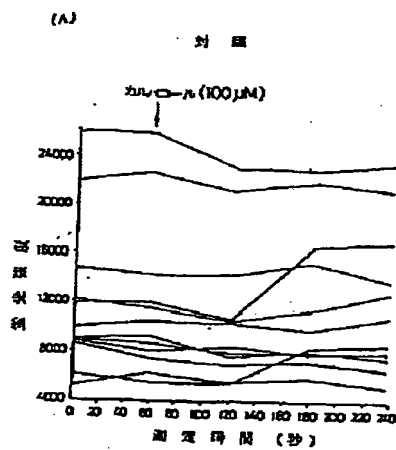
【 図 1 】



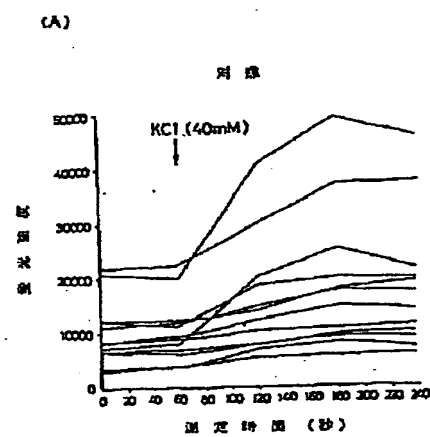
【 図 4 】



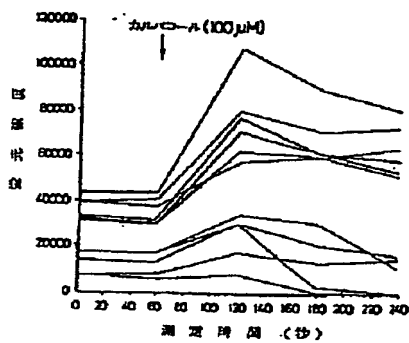
【 図 2 】



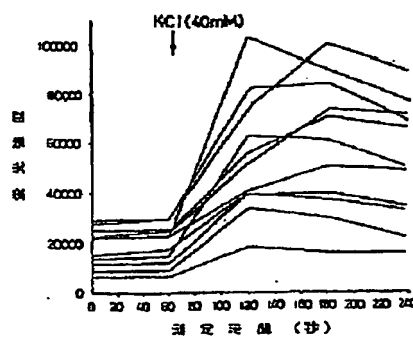
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 清水 岑夫

富山県富山市南田町 1 丁目 4 - 7

(72)発明者 千葉 賢三

石川県金沢市鈴見台 5 丁目 3 - 2 5